

EXPLORATION SANS *A PRIORI* DE LA BIODIVERSITÉ PHYTOVIRALE DE L'IGNAME (*DIOSCOREA* SPP.) EN SERRE DE QUARANTAINE

Denis FILLOUX, Serge GALZI, Emmanuel FERNANDEZ, Philippe ROUMAGNAC

CIRAD/UMR BGPI, TA A-54/K, Campus International de Baillarguet, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

Email : filloux@cirad.fr

Le diagnostic des maladies émergentes ou plus largement le diagnostic associé à des symptomatologies inconnues ou inhabituelles représente un des écueils majeurs du diagnostic de quarantaine. Les techniques classiques de diagnostic, basées sur des cibles spécifiques, ne permettent pas, par essence, de détecter l'ensemble des organismes (pathogènes ou pas) présents à l'intérieur des tissus végétaux. Pourtant, des approches permettant de détecter sans *a priori*, i.e "séquence-indépendantes", les organismes associés à des plantes symptomatiques seraient particulièrement les bienvenues dans la batterie des tests de quarantaine. Nous présentons ici une première approche dite sans *a priori* mise en place pour élucider à l'échelle d'une plante une symptomatologie nouvelle encore non décrite sur igname.

Procédures mises en œuvre

Nous avons développé une technique basée sur un enrichissement en virions par semi-purification, une digestion enzymatique des acides nucléiques résiduels non encapsidés, une amplification aléatoire des ADNc et du clonage/séquençage sur une plante modèle d'igname (*Dioscorea trifida* acc. MP2) infectée par deux potyvirus (YMMV, Yam mild mosaic virus, et YMV, Yam mosaic virus)(photo 1), et sur une plante d'igname (*D. alata* acc. VU564a) symptomatique et possiblement infectée par un ou plusieurs virus inconnus (photo 2).



Photo 2 *D. alata* acc. VU564a (origine Vanouatou) présentant des symptômes d'enroulement foliaire

- Semi-purification par ultra-centrifugation sur coussin de saccharose 30 % tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) à partir de 5g de feuille
- Digestion (2 h, 37°C) Dnase I (Promega) et RNase A (Qiagen)
- Extraction ARN avec RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- Transcription reverse de l'ARN et amplification sans biais de l'ADNc avec le kit TransPlex® Whole Transcriptome Amplification (Sigma-Aldrich)
- Migration (30 mn, 100 V) sur gel agarose 1,2 % TAE et découpe sur gel (photo 3)
- Clonage des produits d'amplification purifiés de 200 à 1000 pb dans vecteur pGEM®-T Easy (Promega) et screening PCR des colonies transformées
- Séquençage par méthode Sanger des plasmides présentant, après screening, les plus gros inserts
- Assemblage en contigs des séquences nucléotidiques avec CAP3
- Recherche semi-automatisée de similarités par BlastN et BlastX contre les bases de données "nucleotide collection (nr/nt)" et "non-redundant protein sequences (nr)" de la Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) avec Koriblast 3.0 (Korilog)



Photo 1 *D. trifida* acc. MP2 (origine Guyane Française) symptomatique et infectée par YMMV et YMV

Mise en évidence de séquences virales

- L'assemblage des séquences obtenues a permis d'éliminer les séquences identiques (doublons) et d'accroître sensiblement leur taille (tableau 1).
- Les recherches BlastN et BlastX ont permis d'identifier sept séquences virales chez les deux plantes (tableau 2 et 3). Un tiers des séquences a une origine végétale et plus de la moitié a une origine inconnue ou difficilement attribuable.
- Quatre séquences de YMMV et une séquence de YMV ont été trouvées chez la plante modèle *D. trifida* confirmant bien la présence de ces deux virus dans cette plante.
- Une séquence de 269 pb codant partiellement pour la protéine VPg de potyvirus révèle la présence d'une nouvelle espèce de potyvirus différente des espèces jusqu'alors décrites sur igname (YMMV et YMV). La plante modèle serait donc porteuse de trois potyvirus et non de deux comme pensé jusqu'alors.
- Chez la plante *D. alata*, aucun virus à ARN n'a été détecté parmi les quatre-vingt séquences obtenues. Cependant, contre toute attente, un fragment de 209 pb, présentant une identité de 65,0 % à la réplicase de bégomovirus, a été trouvé, suggérant la présence d'un bégomovirus inconnu.

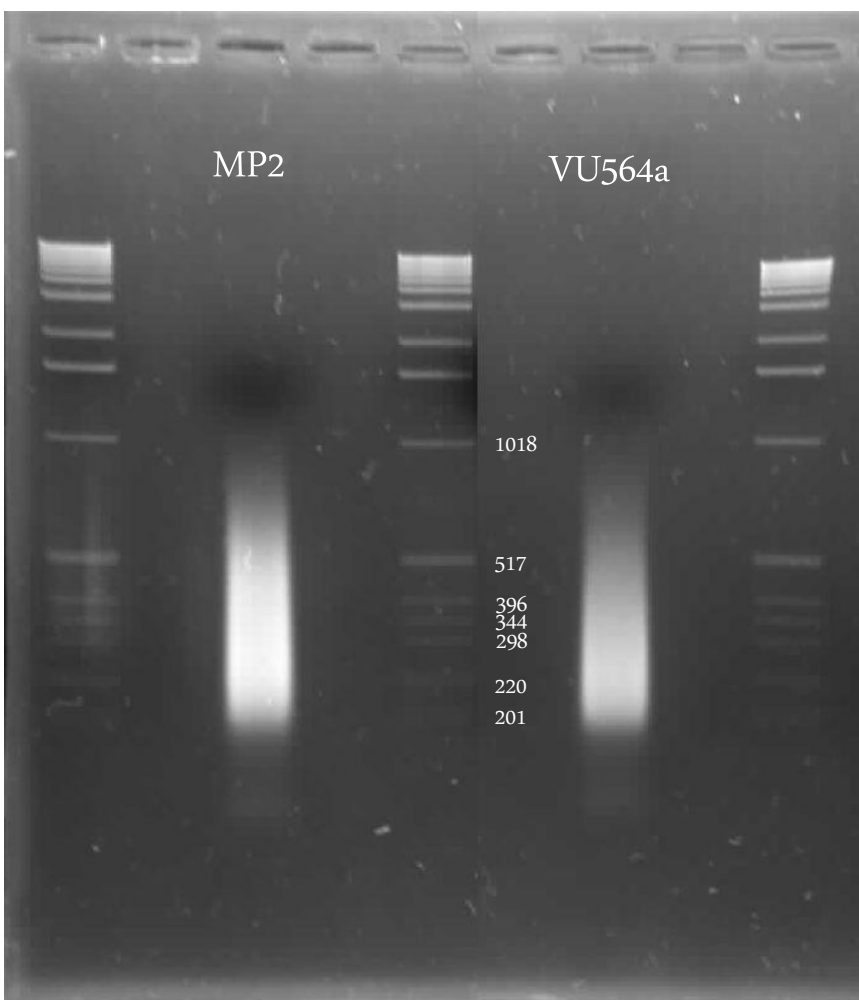


Photo 3 Amplification aléatoire par kit TransPlex® WTA des ARN purifiés de MP2 et VU564a

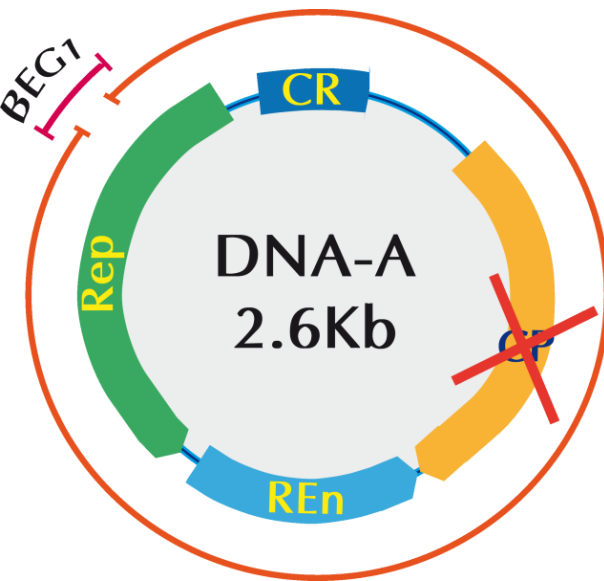
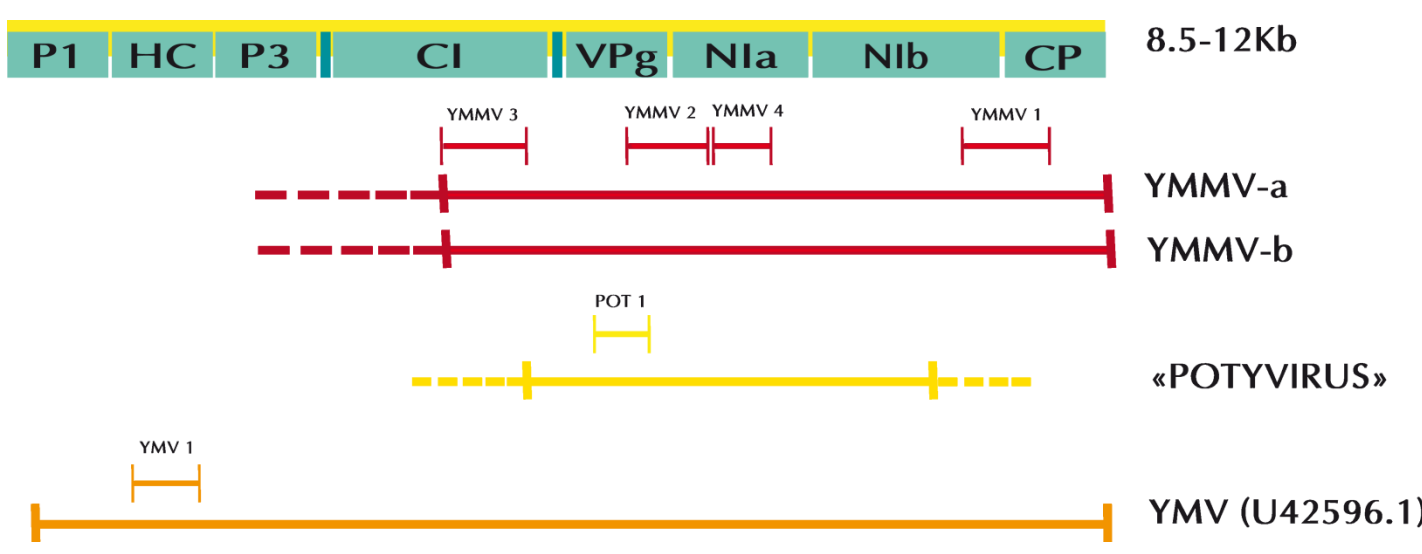
Tableau 3 Liste des séquences virales détectées

Plante	Nom séquence	Longueur séquence (nt)	Recherche NCBI					Identification virale		
			Accession (n° GenBank)	Position	Identité	E-value	Méthode	Genre	Espèce	Gène
MP2	POT1	269	PSbMV (CAC86256.1)	5813-6082	71.9 %	1e-09	BlastX	Potyvirus	?	VPg
	YMMV1	638	SPbMV (FJ795775.1)	8644-9262	70.9 %	2e-110	BlastN	Potyvirus	YMMV	Nib-CP
	YMMV2	455	ChIVMV (GQ981316.1)	5876-6322	64.7 %	4e-50	BlastN	Potyvirus	YMMV	VPg-Nla
	YMMV3	319	PVA (AJ131400.1)	4906-5011	71.7 %	7e-22	BlastN	Potyvirus	YMMV	CI
	YMMV4	121	TVMV (X04083.1)	6262-6349	67.0 %	5e-03	BlastN	Potyvirus	YMMV	Nla
	YMV1	87	YMV (U42596.1)	1653-1732	93.8 %	3e-22	BlastN	Potyvirus	YMV	HC
VU564a	BEG1	209	AbMV (X15983.2)	2367-2566	65.0 %	7e-17	BlastN	Bégomovirus	?	Rep

* Position sur le génome de YMV (U42596.1)

Caractérisation moléculaire des virus détectés

- La présence *in planta* des séquences virales identifiées a été confirmée par PCR et RT-PCR après définition d'amorces au sein de ces séquences.
- L'équivalent de 4596 nt (sur 8,5-12 kb environ du génome des potyvirus) de la région 3' du génome de YMMV a été séquencé par primer walking et par 3'RACE à partir des séquences virales identifiées. A cette occasion, la présence de deux souches distinctes d'YMMV (identité de 87,6 %) a pu être mise en évidence.
- Un fragment de 2453 nt correspondant à la région C-terminal de CI, VPg, Nla et la région N-terminal de Nlb du génome du nouveau potyvirus a été séquencé par primer walking à partir de la séquence virale identifiée.
- A partir de la séquence "bégomovirus", deux génomes viraux complets quasi identiques, d'une taille de 2630 et 2642 nt respectivement, ont été séquencés. Ils s'apparentent au génome A des bégomovirus et présentent une origine de réplication (CR), et au moins deux ORF codant pour la réplicase (Rep) et l'activateur de réplicase (REn). Cependant, aucun gène codant pour la capsid (CP) n'a été trouvé.



Perspectives

- Le séquençage total des nouveaux génomes viraux identifiés sera poursuivi en vue d'une meilleure caractérisation de ces virus.
- Une telle méthode, ultérieurement combinée au séquençage à haut débit, ouvre des perspectives intéressantes pour poursuivre la découverte de nouveaux virus au sein des quarantaines des plantes.



UMR - BGPI
Biologie et Génétique
des Interactions Plante-Parasite

